

PRODUCTION OF R(-)-MANDELIC ACID DERIVATIVE

Patent Number: JP4099496
Publication date: 1992-03-31
Inventor(s): TAMURA KOJI; others: 01
Applicant(s): NITTO CHEM IND CO LTD
Requested Patent: ☐ JP4099496
Application Number: JP19900214915 19900816
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P41/00
EC Classification:
Equivalents: JP2698936B2

Abstract

PURPOSE: To obtain the subject derivative useful as a synthetic raw material for pharmaceuticals and agricultural chemicals in high efficiency from any kind of R,S-mandelonitrile derivatives by treating an R,S-mandelonitrile derivative with a specific microorganism in an aqueous medium.

CONSTITUTION: The objective derivative of formula III can be produced by treating an R,S-mandelonitrile derivative or a mixture of benzaldehyde of formula II and hydrocyanic acid in a nearly neutral or basic aqueous medium with a microbial strain belonging to genus Aureobacterium, Pseudomonas, Caseobacter, Alcaligenes, Acinetobacter, Brevibacterium or Nocardia and capable of stereo-selectively hydrolyzing the nitrile group of an R,S-mandelonitrile derivative of formula I (X is substituent at o-, m- or p-site; the substituent is halogen, hydroxy, etc.) or treated product of the bacterial cell.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-99496

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 平成4年(1992)3月31日

C 12 P 41/00
 //(C 12 P 41/00
 C 12 R 1:01)
 (C 12 P 41/00
 C 12 R 1:38)
 (C 12 P 41/00
 C 12 R 1:05)
 (C 12 P 41/00
 C 12 R 1:13)
 (C 12 P 41/00
 C 12 R 1:365)

C 7823-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全10頁)

④ 発明の名称 R(-)-マンデル酸誘導体の製造法

② 特 願 平2-214915

② 出 願 平2(1990)8月16日

② 発 明 者 田 村 鋼 二 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式
 会社中央研究所内

② 発 明 者 遠 藤 隆 一 神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日東化学工業株式
 会社中央研究所内

② 出 願 人 日東化学工業株式会社 東京都千代田区丸の内1丁目5番1号

明 細 書

1. 発明の名称

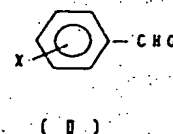
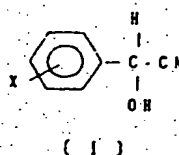
R(-)-マンデル酸誘導体の製造法

2. 特許請求の範囲

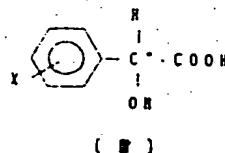
オーレオバクテリウム(Aureobacterium)属、シ
 ュードモナス(Pseudomonas)属、カセオバクテ
 リウム(Caseobacter)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)

属、アシネトバクテリウム(Acinetobacter)属、ブレ
 ビバクテリウム(Brevibacterium)属またはノカル
 ディア(Mycobacteria)属に属し、下記一般式(1)で
 示されるR,S-マンデロニトリル誘導体のニトリル
 基を立体選択的に加水分解する能力を有する微生
 物または培養物を、中性付近ないし塩基性の水
 性媒体中で、一般式(1)で示されるR,S-マンデ
 ロニトリル誘導体または下記一般式(2)で示さ
 れるベンズアルデヒド誘導体と青酸の混合物に作
 用させることにより、原料の一般式(1)で示さ
 れるR,S-マンデロニトリル誘導体または一般式
 (2)で示されるベンズアルデヒド誘導体と青酸

から直接優位置の下記一般式(II)で示される
 R(-)-マンデル酸誘導体を生成せしめることを特
 徴とするR(-)-マンデル酸誘導体の製造法。



(式中、Xはオルト位、メタ位またはパラ位置
 換を意味し、置換基はハロゲン原子、ヒドロキ
 シ基、炭素数1~3個の脂肪族飽和アルキル基、
 炭素数1~3個の脂肪族飽和アルコキシ基、テ
 オアルキル基、アミノ基、ニトロ基、フェニル
 基またはフェノキシ基を表す。)



(式中、Xの定義は上記一般式(1)および
 (II)と同じである。)

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はR(-)-マンデル酸誘導体の製造法に関する。更に詳しくは、後記一般式(Ⅰ)で示されるR,S-マンデロニトリル誘導体に対してニトリル不斉加水分解活性を有する微生物を作用させ、後記一般式(Ⅲ)で示されるR(-)-マンデル酸誘導体を製造する方法に関する。該マンデル酸誘導体は多種の医薬薬品の合成原料として工業的に重要である。

〔従来の技術とその問題点〕

R(-)-マンデル酸誘導体の生物学的製造法としては、(1)D-オキシニトリラーゼにより不斉合成した置換R(-)-マンデロニトリルの加水分解による製造法(特開昭63-219388号、特開平2-5885号各公報参照)、(2)アルカリゲネス属、シュードモナス属、ロドシュードモナス属、コリネバクテリウム属、アシネトバクター属、バチルス属、マイコバクテリウム属、ロドコッカス属またはキャンディダ属の微生物による置換マンデロニトリルまたは

ズアルデヒドと青酸を原料とし、R(-)-マンデル酸を工業的に有利に製造する方法の開発を目的として検討を進めた結果、先に、R,S-マンデロニトリルまたはベンズアルデヒドと青酸を、中性付近ないしは塩基性の水性媒体中で、シュードモナス(Pseudomonas)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属またはカセオバクター(Caseobacter)属等の微生物を用いて、中性ないし塩基性の水性媒体中で、R,S-マンデロニトリルまたはベンズアルデヒドと青酸からは化学量論的にR(-)-マンデル酸を生成し得ることを見出し特許出願した(特開平2-80694号明細書参照)。その後、さらに後記一般式(Ⅰ)で示されるR,S-マンデロニトリル誘導体に対してニトリル不斉加水分解活性を有する微生物の探索を進めた結果、オーレオバクテリウム(Aureobacterium)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、カセオバクター(Caseobacter)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、ブレビバクテリウム(Brevibacteri-

um)属またはノカルディア(Nocardia)属に属する微生物が、該目的を達成し得ることを見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、オーレオバクテリウム(Aureobacterium)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、カセオバクター(Caseobacter)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)属またはノカルディア(Nocardia)属に属し、下記一般式(Ⅰ)で示されるR,S-マンデロニトリル誘導体のニトリル基を立体選択的に加水分解する能力を有する微生物または該処理物を、中性付近ないし塩基性の水性媒体中で、一般式(Ⅰ)で示されるR,S-マンデロニトリル誘導体または下記一般式(Ⅱ)で示されるベンズアルデヒド誘導体と青酸の混合物に作用させることにより、原料の一般式(Ⅰ)で示されるR,S-マンデロニトリル誘導体または一般式(Ⅱ)で示されるベンズアルデヒド誘導体と青酸から直接優位置の下記一般式(Ⅲ)で示されるR(-)-マンデル酸誘導体を

置換マンデルアミドの不斉加水分解によるR(-)-マンデル酸誘導体の製造法(特開平2-84198号公報参照)などが知られている。

しかしながら、(1)のD-オキシニトリラーゼ法においては、光学活性置換マンデロニトリルが得られたという基礎的知見の開示にすぎず、未だ充分な工業化研究は行われていない。(2)の置換マンデロニトリルまたは置換マンデルアミドの不斉加水分解法に関しては、ラセミ体の原料から直接優位置の光学活性体を製造するものではなく、残存する他方の光学活性体の処理が必要となる。また、同公報には置換マンデロニトリルからのR(-)-マンデル酸誘導体の製造についての具体例も無く、R(-)-マンデル酸誘導体が効率よく高い光学純度で得られるかどうかについては全く不明である。

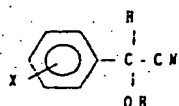
このように従来公知の方法は種々の問題点を含み、R(-)-マンデル酸誘導体の製造に関して、いずれの方法も工業的に有利な製造法とはなり難い。

〔問題点を解決するための手段〕

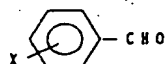
〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らはR,S-マンデロニトリルまたはベンズアルデヒドと青酸を原料とし、R(-)-マンデル酸を工業的に有利に製造する方法の開発を目的として検討を進めた結果、先に、R,S-マンデロニトリルまたはベンズアルデヒドと青酸を、中性付近ないしは塩基性の水性媒体中で、シュードモナス(Pseudomonas)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属またはカセオバクター(Caseobacter)属等の微生物を用いて、中性ないし塩基性の水性媒体中で、R,S-マンデロニトリルまたはベンズアルデヒドと青酸からは化学量論的にR(-)-マンデル酸を生成し得ることを見出し特許出願した(特開平2-80694号明細書参照)。その後、さらに後記一般式(Ⅰ)で示されるR,S-マンデロニトリル誘導体に対してニトリル不斉加水分解活性を有する微生物の探索を進めた結果、オーレオバクテリウム(Aureobacterium)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、カセオバクター(Caseobacter)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、ブレビバクテリウム(Brevibacteri-

生成せしめることを特徴とするR(-)-マンデル酸誘導体の製造法、である。

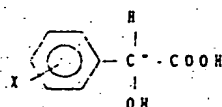


(I)



(II)

(式中、X はオルト位、メタ位またはパラ位置換を意味し、置換基はハロゲン原子、ヒドロキシ基、炭素数1～3個の脂肪族飽和アルキル基、炭素数1～3個の脂肪族飽和アルコキシ基、チオアルキル基、アミノ基、ニトロ基、フェニル基またはフェノキシ基を表す。)



(III)

(式中、X の定義は上記一般式(I)および(II)と同じである。)

バクテリウム (Acinetobacter) sp. BC9-2 (微工研国寄第11262号)、ブレビバクテリウム アセチリカム (Brevibacterium acetylicum) IAM 1790およびノカルディア アステロイデス (Nocardia asteroides) IF0 3384 が挙げられ、またこれらの変異株を用いることもできる。

これらの微生物のうち、オーレオバクテリウム テスタセウム IAM 1561、ブレビバクテリウム アセチリカム IAM 1790 およびノカルディア アステロイデス IF0 3384 は公知であり、東京大学応用微生物研究所 (IAM) または財団法人醗酵研究所 (IFO) から容易に入手できる。

シュードモナス sp. BC13-2、カセオバクテリウム sp. BC4、アルカリゲネス sp. BC35-2 およびアシネトバクテリウム sp. BC9-2は、本出願人により新たに土壌中より分離されたものであり、いずれも上記番号にて工業技術院 微生物工業技術研究所 (微工研) に寄託されており、それぞれの菌学的性質は以下に示すとおりである。

上記したところを要旨とする本発明は、一般式(I)で示されるR,S-マンデロニトリル誘導体が、中性ないし塩基性の水性媒体中で、一般式(II)で示されるベンズアルデヒド誘導体と有機酸との間で解離平衡することにより容易にラセミ化するという性質を利用し、このラセミ化反応の系と該マンデロニトリル誘導体の不斉加水分解活性を有する微生物とを共役させることにより、一般式(I)で示されるR,S-マンデロニトリル誘導体または一般式(II)で示されるベンズアルデヒド誘導体と有機酸とを、直接R-体優位に一般式(III)で示されるマンデル酸誘導体に変換し得るとの本発明者らにより見出された知見に基づくものである。

本発明で使用する微生物は、例えば、オーレオバクテリウム テスタセウム (Aureobacterium testaceum) IAM 1561、シュードモナス (Pseudomonas) sp. BC13-2 (微工研国寄第11266号)、カセオバクテリウム (Caseobacter) sp. BC4 (微工研国寄第11260号)、アルカリゲネス (Alcaligenes) sp. BC35-2 (微工研国寄第11265号)、アシネト

BC13-2菌株

形 態	標 本
グラム染色性	-
芽 胞	-
運 動 性	+
鞭 毛	極 毛
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	+
O F	O

BC4菌株

形 態	多 形 性 標 本
グラム染色性	+
芽 胞	-
運 動 性	+
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	+
rod-coccus cycle	+
菌落の周辺細胞の伸長	認めず
嫌気下での生育	-
菌細胞のジアミノ酸	yeso-ジアミノピリン酸

クリコリル試験

(アセチル型)

細菌型の組成

アラビノース

+

ガラクトース

+

キノン系

RX-8(R₁)

BC35-2菌株

形態

桿 菌

グラム染色性

-

芽 胞

-

運動性

+

鞭 毛

周 毛

オキシダーゼ

+

カタラーゼ

+

O F

アルカリ化

3-ヒドロキシ-2-の産生

-

キノン系

0-8

BC9-2菌株

形態

桿 菌

グラム染色性

-

芽 胞

-

れる。また、これらの培地に酵母エキス、肉エキス、蜂蜜などの天然培地を添加したものも使用することができる。

培養初期または中期に生育を大きく阻害しない濃度のケイ皮酸ニトリル、ベンジルシアニド、イソブチロニトリル、ベンゾニトリル、1-シクロヘキセニルアセトニトリル、 β -フェニルプロピオニトリル、4-シアノピリジン、フェニルスルフェニルアセトニトリル、 γ -ブチロニトリルなどのニトリル類またはイソブチルアミド、4-ピリジンカルボン酸アミド、フェニルアセトアミドなどのアミド類を酵素誘導物質として添加することにより高い酵素活性が得られる。

使用する培地のpHは4~10、培養温度は5~50℃の範囲で選べばよく、培養は1~14日程度、好氣的に行い、活性が最大となるまで継続すればよい。

R,S-マンデロニトリル誘導体の不斉加水分解反応は、上記の方法において培養した微生物の菌体または菌体処理物(菌体の破砕物、粗・精製酵素、

運動性

-

オキシダーゼ

-

カタラーゼ

+

O F

-

以上の菌学的性質をバージェーズ マニュアルオブ システマティック バクテリオロジー

(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,

1986)に従って分類すると、BC13-2はシェードモナス(Pseudomonas)属、BC4 はカセオバクター(Caseobacter)属、BC35-2はアルカリゲネス(Alcaligenes)属およびBC9-2 はアシネトバクター(Acinetobacter)属に属する細菌とそれぞれ同定された。

次に本発明の実施態様について説明する。

本発明に使用される微生物の培養は質化し得るグリセロール、グルコース、サッカロースなどの炭素源、尿素、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウムなどの窒素源、微生物の生育に必須の塩化マグネシウム、塩化カルシウム、塩化鉄などの無機栄養素などを含有した通常の培地を用いて行なわ

る。固定化菌体(酵素等)を水または緩衝液等の水性媒体中で、R,S-マンデロニトリル誘導体またはベンズアルデヒドと青酸の混合物に接触させることによつて行われる。本発明においては、前述のようにマンデロニトリル誘導体をラセミ化するために、反応系を中性付近ないしは塩基性に保つことが必須であり、pHを4~11、好ましくは6~10に調整する。その他、本発明における反応条件はベンズアルデヒド誘導体や青酸に対する酵素の感受性により一概に特定し得ないが、通常、反応液中マンデロニトリル誘導体は0.1~10重量%、好ましくは0.2~5.0重量%、ベンズアルデヒド誘導体は0.1~10重量%、好ましくは0.2~5.0重量%、青酸は0.1~1.0重量%、好ましくは0.1~0.5重量%であり、マンデロニトリル誘導体等基質に対する微生物の使用量は、乾燥菌体として0.01~5.0重量%、反応温度は0~50℃、好ましくは10~30℃で0.1~100時間反応させればよい。また、R,S-マンデロニトリル誘導体もしくはベンズアルデヒド誘導体が、水性媒体に対する溶解度

が著しく小さい場合には、反応は均一相でも行えるが、反応液中に 0.1~10重量%の濃度となるように Triton X-100、Tween 60などの界面活性剤または混合溶媒としてエタノール、ジメチルスルホキシド（以下、DMSOと省略する。）を添加することにより、反応を効率よく行うことができる。

かくして、R,S-マンデロニトリル誘導体またはベンズアルデヒド誘導体と青酸は水性媒体中で起こる解離平衡反応によるラセミ化反応と微生物によるニトリルの不斉加水分解反応との共役により高収率で光学活性なマンデル酸誘導体に変換され蓄積される。生成物の分離は、固体等の不溶物を除去した反応液につき、濃縮、イオン交換、電気透析、抽出、晶析などの公知の方法を利用して行うことができる。

〔発明の効果〕

本発明によれば、ラセミ体のR,S-マンデロニトリル誘導体またはベンズアルデヒド誘導体と青酸から直接優位置（50~100%）のR(-)-マンデル酸誘導体が製造でき、化学量論的に全ての原料を

R(-)-マンデル酸誘導体に変換することも可能であり、極めて効率のよいR(-)-マンデル酸誘導体の製造法を提供し得る。

〔実験例〕

次に、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

(i) 培 養

オーレオバクテリウム テスタセウム IAM 1561株を下記の条件で培養した。

1) 培 地

(A培地)

グリセロール	20	g / l
酵母エキス	6	g / l
リン酸一カリウム	6.8	g / l
リン酸二ナトリウム	7.1	g / l
硫酸ナトリウム	2.8	g / l
塩化マグネシウム	0.4	g / l
塩化カルシウム	4×10^{-3}	g / l

硫酸マンガソ	4×10^{-3} g / l
塩化鉄	6×10^{-3} g / l
硫酸亜鉛	3×10^{-3} g / l
蒸留水	1000 ml
pH	7.5

(B培地)

A培地に0.02重量%の1-シクロヘキセニルアセトニトリルを添加した。

ii) 培養条件

好氣的条件下にA培地にて30℃、72時間培養後、得られた固体を更にB培地にて30℃、90時間培養した。

(2) R,S-2-クロロマンデロニトリルからのR(-)-2-クロロマンデル酸の生産

得られた培養液から固体を分離して50ml-リン酸緩衝液(pH 7.5)で洗浄し、同リン酸緩衝液10mlに懸濁し、休止固体反応液を調製した(OD₆₀₀ 26)。この液にR,S-2-クロロマンデロニトリルを14.5mlの濃度となるように添加し、30℃で3時間反応を行った。反応終了液から遠心分離により固体を分

去した後、その上清を液体クロマトグラフィー（カラム：SHODEX ODS F511A、キャリア：0.2M H₃PO₄、アセトニトリル=4：1、モニター：208nm）で分析したところ、12.9minの2-クロロマンデル酸が生成していた（収率：89%）。また、生成した2-クロロマンデル酸の光学純度を光学分割用キラルセル(CHIRALPAK NH column)により分析したところ、98.2% eeのR(-)-2-クロロマンデル酸が確認された。

実施例 2

(i) 培養と固体の調製

オーレオバクテリウム テスタセウム IAM 1561株を実施例1と同様の条件で培養し、固体懸濁液(OD₆₀₀ 26)を調製した。

(2) 2-クロロベンズアルデヒドと青酸からのR(-)-2-クロロマンデル酸の生産

2-クロロベンズアルデヒドと青酸を各々について14mlとなるように固体懸濁液に添加し、30℃で3時間振盪しながら反応を行った。反応終了液から固体を除去した後、実施例1と同様の分析条件

により分析したところ、13.2mMの2-クロロマンデル酸が生成しており（収率：94.3%）、光学純度は98.1%eeであった。

実施例3

(1) 培養と固体の調製

オーレオバクテリウム テスタセウム IAM 1561株を実施例1と同様の条件で培養し、固体懸濁液（OD₅₅₀ = 58.1）を調製した。

(2) 4-フェニルベンズアルデヒドと青酸からの

R(-)-4-フェニルマンデル酸の生産

固体懸濁液に対し4-フェニルベンズアルデヒドと青酸を各々1.0mM、DMSOが1.4M（10重量%）となるように添加し、30℃で23時間反応を行った。反応終了液から固体を除去した後、実施例1と同様に液体クロマトグラフィーで分析したところ、0.71mMの4-フェニルマンデル酸が生成していた（収率：71%）。また、その光学純度を分析したところ、76.7%eeのR(-)-4-フェニルマンデル酸であった。

実施例4

オーレオバクテリウム テスタセウム IAM 1561株を用いて、表-1に示した各種R(-)-マンデル酸誘導体の生産を行った。

(1) 培養と固体の調製


オーレオバクテリウム テスタセウム IAM 1561株を実施例1と同様の条件で培養し、固体懸濁液を調製した。

(2) R(-)-マンデル酸誘導体の生産

固体懸濁液（OD₅₅₀ = 5 ~ 79.3）に対し、R,S-マンドロニトリル誘導体、またはベンズアルデヒド誘導体と青酸とを表-1に示した濃度で各々添加し、30℃で2 ~ 20時間振盪しながら反応した。反応終了液から固体を除去した後、実施例1に示した方法により、液体クロマトグラフィーで分析し反応収率と生成物の光学純度を求めた。

結果を表-1に示した。

表 - 1

基 質 名	基質量 (mM)	固 体 量 (OD ₅₅₀)	反応時間 (時間)	R(-)-マンデル酸誘導体			
				X	生成量(mM)	収率(%)	光学純度(%ee)
3-クロロマンロニトリル	11.0	26.0	2	3 Cl-	9.3	84.5	95.6
4-クロロマンロニトリル	13.9	26.0	3	4 Cl-	12.7	91.4	100
4-ブロマンロニトリル	4.1	5.0	16	4 Br-	3.3	80.5	100
4-フルオロマンロニトリル	4.0	40.0	20	4 F-	3.5	87.5	96.0
4-ヒドロキシベンズアルデヒド 青酸	7.4 8.6	5.0	17	4 HO-	7.5	101.4	97.6
4-メチルベンズアルデヒド 青酸	8.3 10.3	5.0	17	4 CH ₃ -	8.0	96.4	100
4-メトキシベンズアルデヒド 青酸	9.6 10.5	5.0	17	4 CH ₃ O-	6.7	69.8	100
4-メチルフェニルマンロニトリル	4.5	26.0	20	4 CH ₃ S-	3.1	68.9	93.0
4-イソプロピルマンロニトリル (10% DMSO添加)	0.8	61.6	18	4(CH ₃) ₂ CH-	0.6	75.0	63.0
4-アミノマンロニトリル	5.5	26.0	20	4 H ₂ N-	4.3	78.2	87.0
4-ニトロマンロニトリル	4.0	26.0	20	4 O ₂ N-	2.6	65.0	83.0
3-フェノキシマンロニトリル (10% DMSO添加)	1.7	79.3	20	3 	1.2	70.6	29.0

実施例 5

シュードモナス sp. BC13-2 株を用いて R(-)-マンドル酸誘導体の生産を行った。

(1) 培養と固体の調製


シュードモナス sp. BC13-2 株を実施例 1 と同様の条件で培養し固体懸濁液を調製した。

(2) R(-)-マンドル酸誘導体の生産

実施例 4 と同様に固体懸濁液 (OD₅₅₀ = 9 ~ 99.7) に対し、R,S-マンドロニトリル誘導体またはベンズアルデヒド誘導体と青酸とを表-2 に示した濃度で各々添加し、30℃で 4 ~ 24 時間振盪しながら反応した。反応終了液から固体を除去した後、実施例 1 に示した方法により液体クロマトグラフィーで分析し、反応収率と生成物の光学純度を求めた。

結果を表-2 に示した。

表-2

添 加 名	基質濃度 (mM)	固 体 濃 度 (OD ₅₅₀)	反 応 時 間 (時間)	R(-)-マンドル酸誘導体		
				X	生成量 (mM)	収 率 (%)
2-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	14.5	24.0	4	2Cl ₂	13.5	93.1
3-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	11.0	24.0	4	3Cl ₂	9.1	82.7
4-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	13.9	24.0	24	4Cl ₂	9.0	64.7
4-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	7.4	9.0	17	4H ₂ O	7.3	98.6
青酸	8.0					100
4-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	8.3	24.0	17	4CH ₃	8.0	96.4
青酸	10.3					100
4-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	4.8	52.7	17	4CH ₃ O	3.7	77.1
青酸	5.1					100
4-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one (10% DMSO 添加)	1.3	99.7	20	4(CH ₃) ₂ CH	0.8	61.5
青酸	2.5					62.0
3-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one (10% DMSO 添加)		99.7	23		1.5	60.0
青酸						90.7

実施例 6

カセオバクター sp. BC4 株を用いて、R(-)-マンドル酸誘導体の生産を行った。

(1) 培養と固体の調製

カセオバクター sp. BC4 株を実施例 1 と同様の条件で培養し、固体懸濁液を調製した。

(2) R(-)-マンドル酸誘導体の生産

実施例 4 と同様に固体懸濁液 (OD₅₅₀ = 13 または 39) に対し、R,S-マンドロニトリル誘導体またはベンズアルデヒド誘導体と青酸とを表-3 に示した濃度で各々添加し、30℃で 2 ~ 20 時間振盪しながら反応した。反応終了液から固体を除去した後、実施例 1 に示した方法により液体クロマトグラフィーで分析し、反応収率と生成物の光学純度を求めた。

結果を表-3 に示した。

表-3

添 加 名	基質濃度 (mM)	固 体 濃 度 (OD ₅₅₀)	反 応 時 間 (時間)	R(-)-マンドル酸誘導体		
				X	生成量 (mM)	収 率 (%)
2-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	14.5	39.0	2	2Cl ₂	9.6	66.2
3-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	11.0	39.0	2	3Cl ₂	9.3	84.5
4-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	13.9	39.0	3	4Cl ₂	12.6	90.6
4-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	4.1	13.0	16	4H ₂ O	2.9	70.7
青酸	7.4					100
4-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	8.0	13.0	17	4H ₂ O	6.3	85.1
青酸	8.3					94.8
4-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	10.3	13.0	17	4CH ₃	8.3	100
青酸	9.6					100
4-phenyl-2-hydroxy-1-phenylethan-1-one	10.5	13.0	20	4CH ₃ O	7.3	76.0
青酸						100

実施例 7

アルカリゲネス sp. BC35-2 株を用いて、R(-)-マントル酸誘導体の生産を行った。

(1) 培養と菌体の調製

アルカリゲネス sp. BC35-2 株を実施例 1 と同様の条件で培養し、菌体懸濁液を調製した。

(2) R(-)-マントル酸誘導体の生産

実施例 4 と同様に菌体懸濁液 (OD₅₅₀ = 14.8 または 28) に対し、R,S-マントロニトリル誘導体またはベンズアルデヒド誘導体と青酸とを表-4 に示した濃度で各々添加し、30℃で 2~17 時間振盪しながら反応した。反応終了液から菌体を除去した後、実施例 1 に示した方法により液体クロマトグラフィーで分析し、反応収率と生成物の光学純度を求めた。

結果を表-4 に示した。

試 験 名	基質濃度 (mM)	菌 体 濃 度 (OD ₅₅₀)	反 応 時 間 (時間)	R(-)-マントル酸誘導体			
				X	生成量 (mM)	収 率 (%)	光学純度 (%ee)
2-マントロニトリル誘導体	14.5	28.0	2	2Cl-	10.3	71.0	93.1
3-マントロニトリル誘導体	11.0	28.0	2	3Cl-	9.3	84.5	84.8
4-マントロニトリル誘導体	13.9	28.0	2	4Cl-	8.7	62.6	98.3
4-マントロニトリル誘導体	4.1	14.8	16	4Br-	3.5	85.4	100
4-マントロニトリル誘導体	7.4	14.8	17	4HO-	7.4	100	100
青酸	7.6	14.8	17	4CH ₃ -	8.3	100	100
青酸	10.3	14.8	17	4CH ₃ -	9.6	100	100
青酸	10.8	14.8	17	4CH ₃ -	9.6	100	100

実施例 8

アシネトバクター sp. BC9-2 株を用いて、R(-)-マントル酸誘導体の生産を行った。

(1) 培養と菌体の調製

アシネトバクター sp. BC9-2 株を実施例 1 と同様の条件で培養し菌体懸濁液を調製した。

(2) R(-)-マントル酸誘導体の生産

実施例 4 と同様に菌体懸濁液 (OD₅₅₀ = 7.1 ~ 28.2) に対し、R,S-マントロニトリル誘導体または置換ベンズアルデヒドと青酸とを表-5 に示した濃度で各々添加し、30℃で 9~20 時間振盪しながら反応した。反応終了液から菌体を除去した後、実施例 1 に示した方法により液体クロマトグラフィーで分析し、反応収率と生成物の光学純度を求めた。

結果を表-5 に示した。

試 験 名	基質濃度 (mM)	菌 体 濃 度 (OD ₅₅₀)	反 応 時 間 (時間)	R(-)-マントル酸誘導体			
				X	生成量 (mM)	収 率 (%)	光学純度 (%ee)
3-マントロニトリル誘導体	11.0	22.0	20	3Cl-	7.3	66.3	100
4-マントロニトリル誘導体	13.9	22.0	9	4Cl-	11.3	81.3	100
2-マントロニトリル誘導体	4.1	7.1	16	4Br-	3.6	87.8	100
青酸	7.4	7.1	16	4HO-	5.6	78.9	91.6
青酸	8.6	28.2	17	4CH ₃ -	7.0	84.3	100
青酸	9.3	7.1	17	4CH ₃ -	0.4	66.7	100

実施例 9

プレビバクテリウム アセチリウム IAH 1790

株を用いて、R(-)-マンデル酸誘導体の生産を行った。

(1) 培養

プレビバクテリウム アセチリウム IAH 1790

株を下記の条件で培養した。

i) 培地

グリセロール	5 g / l
酵母エキス	0.2 g / l
リン酸一カリウム	6.8 g / l
リン酸二ナトリウム	7.1 g / l
硫酸ナトリウム	2.8 g / l
塩化マグネシウム	0.4 g / l
塩化カルシウム	4×10^{-3} g / l
硫酸マンガ	4×10^{-3} g / l
塩化鉄	6×10^{-3} g / l
硫酸亜鉛	3×10^{-3} g / l
ベンジルシアニド	0.5 g / l
寒天	18 g / l

蒸留水

1000 ml

pH

7.5

ii) 培養条件

培地を調整し30℃、12時間培養した。

(2) R(-)-マンデル酸誘導体の生産

平板培地から菌体を取り出し50mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) で1回洗浄し、同リン酸緩衝液10mlに懸濁して反応用休止固体懸濁液 (OD₅₅₀ = 30) を調整した。この液に表-6に示したベンズアルデヒド誘導体と青酸とを各々添加し、30℃で20時間培養しながら反応させた。反応終了液は菌体を除去した後、実施例1に示した方法により分析し反応収率と生成物の光学純度を求めた。

結果を表-6に示した。

実施例 10

ノカルディア アステロイデス IF0 3384 株を

用いて、R(-)-マンデル酸誘導体の生産を行った。

(1) 培養と固体の調整

ノカルディア アステロイデス IF0 3384 株を

実施例9と同様の条件で培養し、固体懸濁液 (OD₅₅₀ = 30) を調整した。

(2) R(-)-マンデル酸誘導体の生産

固体懸濁液に表-7に示したベンズアルデヒド誘導体と青酸とを各々添加し、実施例9と同様に反応を行い生成物の分析を行った。

結果を表-7に示した。

表 - 6

試 験 名	濃 度 (mM)	固 体 量 (OD ₅₅₀)	反 応 時 間 (時間)	R(-)-マンデル酸誘導体	
				収 率 (%)	光学純度 (%)
4-ヒドロキシベンズアルデヒド	4.6	30.0	20	2.9	63.0
青酸	4.7	30.0	20	6.0	72.3
4-ヒドロキシベンズアルデヒド	8.3	30.0	20		100
青酸	8.3	30.0	20		

表 7

基 質 名	基質量 (mg)	固 体 量 (0D ₂₀)	反応時間 (時間)	R(-)-マンデル酸誘導体			
				X	生成量 (mg)	収 率 (%)	光学純度 (%ee)
4-ヒドロキシベンズアルデヒド 酢酸	4.6 4.7	30.0	20	480-	3.9	84.8	96.2
4-メチルベンズアルデヒド 酢酸	8.3 8.3	30.0	20	4CB-	6.2	74.7	100

特 許 出 願 人

日 東 化 学 工 業 株 式 会 社